

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :<br><b>C07H 19/04, 21/00, A61K 31/70, C12Q 1/68</b>   |  | A1  | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/11011</b><br>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>2. März 2000 (02.03.00)</b> |
| (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/06036</b><br>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. August 1999 (18.08.99)</b>   |  | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  |  |
| (30) Prioritätsdaten:<br>198 37 387.2 18. August 1998 (18.08.98) DE  |  | Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |  |
| (71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO. KG [DE/DE]; D-65929 Frankfurt am Main (DE).   |  |   |  |
| (72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICULKA, Christian [AT/DE]; Gebeschusstrasse 36, D-65929 Frankfurt am Main (DE). WAGNER, Thomas [DE/DE]; Römerstrasse 18, D-65719 Hofheim (DE). WINDHAB, Norbert [DE/DE]; Akazienstrasse 28, D-65795 Hattersheim (DE).              |  |   |  |
| (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Innsbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).   |  |   |  |
| <b>(54) Title:</b> 3'-DESOXPENTOPYRANOSYL NUCLEIC ACID, ITS PRODUCTION AND ITS USE   |  |   |  |
| <b>(54) Bezeichnung:</b> 3'-DESOXPENTOPYRANOSYL-NUCLEINSÄURE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG  |  |   |  |
| <b>(57) Abstract</b>   |  |   |  |
| The invention relates to a 3'-desoxypentopyranosyl nucleic acid consisting substantially of 3'-desoxypentopyranosyl nucleosides of formula (I) or formula (II), its production and its use in the preparation of a therapeutic or diagnostic agent and/or an electronic component.             |  |   |  |
| <b>(57) Zusammenfassung</b>  |  |   |  |
| Die Erfindung betrifft eine 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure, bestehend im wesentlichen aus 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden der Formel (I) oder der Formel (II), ihre Herstellung und Verwendung zur Herstellung eines Therapeutikums, Diagnostikums und/oder elektronischen Bauteils. |  |   |  |
|  |  |   |  |
|  |  |   |  |

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

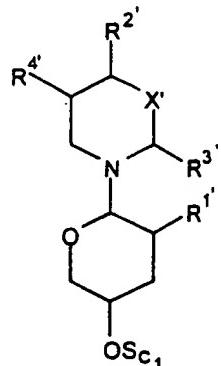
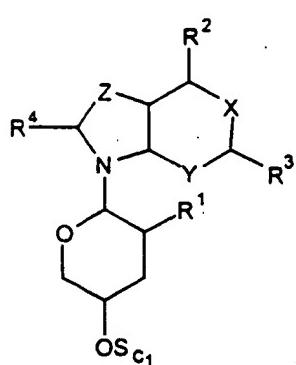
Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         | ML | Mali   | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | MN | Mongolei   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MR | Mauritanien  | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MW | Malawi   | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MX | Mexiko   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | PL | Polen  |    |                                   |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |
| EE | Estland                      |    |                                      |    |  |    |                                   |

5

## **3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure, ihre Herstellung und Verwendung**

- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft eine 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure bestehend im wesentlichen aus 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden  
der Formel (I) oder der Formel (II)



15 (I) (II),

ihrer Herstellung und Verwendung zur Herstellung eines Therapeutikums, Diagnostikums und/oder elektronischen Bauteils.

- 20 Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) sind im allgemeinen zur natürlichen RNA isomere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorliegen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den Positionen C-2' und C-4' repetitiv verknüpft sind. Unter "Nucleobase" werden dabei die kanonischen Nucleobasen A, T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und 2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere Purine und Pyrimidine verstanden. p-NA's, und zwar die von der Ribose abgeleitete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2161; Helv. Chim Acta 1995, 78, 1621; Angew. Chem. 1996, 108, 1619-1623). Sie bilden ausschließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d. h. Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, quasi-lineare

und stabile Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der 5 Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und lässt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranosersings am Aufbau des Rückgrates zurückführen. Diese wesentlich besseren Paarungseigenschaften machen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die Anwendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten 10 Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's, was im besonderen im diagnostischen Bereich von Bedeutung ist.

Die p-RNA zeigt jedoch folgende Nachteile, die auf die Anwesenheit der 3'- 15 Hydroxylfunktion zurückzuführen sind:

1. Der notwendige Schutz der 3'-Hydroxylgruppe mit einer Benzoylschutzgruppe erschwert und verlängert den Syntheseweg zu den monomeren Bausteinen erheblich.
- 20 2. Aufgrund der Verwendung des Allylrestes als Basen- und Phosphatschutzgruppe muß die Entschützung und die Abspaltung des Oligonucleotids durch zwei hintereinandergeschaltete Schritte erfolgen. Zuerst werden die Allylreste nach der Noyori-Methode (R. Noyori, J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1691-6) entfernt. Anschliessend müssen die basenlabilen Acylgruppen abgespalten und das Oligonucleotid vom Träger entfernt werden.
- 25 3. Nach beendeter Oligonucleotidsynthese bereitet die Abspaltung der 3'-Benzoylreste vom Oligonucleotid Schwierigkeiten. Um diese Reste effektiv zu entfernen ist die Verwendung von Hydrazin notwendig, was zu Ringöffnungen der Pyrimidinbasen, vor allem Uracil und Thymin, führen kann.
- 30 4. Bei der Synthese der Oligonucleotide wird 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol als Kupplungsreagenz in der automatisierten p-RNA-Synthese eingesetzt. Die Konzentration dieses Reagens in der Lösung von Tetrazol in Acetonitril ist dabei so hoch, daß im allgemeinen das 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol in den dünnen Schläuchen des Synthesizers

auskristallisiert und die Synthese somit zu einem vorzeitigen Ende kommt. Zudem wurde beobachtet, daß die Oligomeren mit 5-(4-Nitrophenyl)-1H-tetrazol verunreinigt waren. Auch das alternativ verwendete Benzimidazolium-Triflat weist negative Seiten auf: es kristallisiert, wenn auch seltener, in den Schläuchen aus, ist teuer und muß vor seiner Verwendung zudem umkristallisiert werden.

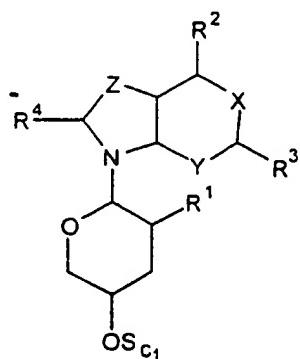
Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, neue Pentopyranosyl-Nucleoside für orthogonale Paarungssysteme bereitzustellen und zu oligomerisieren, wodurch die oben beschriebenen Nachteile umgangen werden können.

10

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäuren (p-DNA) die beschriebenen Nachteile nicht aufweisen und dennoch die vorteilhaften orthogonalen Paarungseigenschaften besitzen (siehe Fig. 3).

15

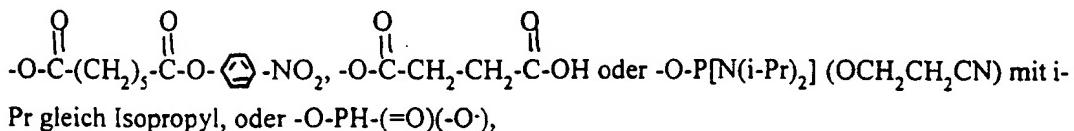
Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure bestehend im wesentlichen aus 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden der Formel (I),



(I)

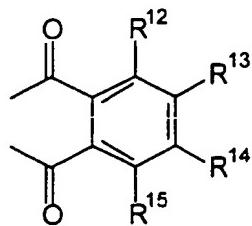
20 worin

R<sup>1</sup> gleich H, OH, Hal mit Hal gleich Br oder Cl, ein Rest ausgewählt aus



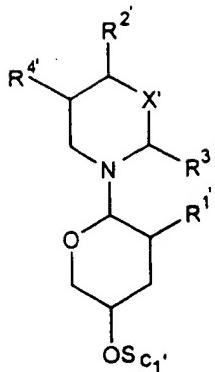
25

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, OR<sup>7</sup>, SR<sup>8</sup>, =O, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> mit n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, eine β-eliminierbare Gruppe, vorzugsweise eine Gruppe der Formel -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R<sup>18</sup> mit R<sup>18</sup> gleich ein Cyano- oder p-Nitrophenylrest oder ein Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Rest, oder 5 (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> mit R<sup>10</sup>R<sup>11</sup> gleich H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder R<sup>10</sup>R<sup>11</sup> verbunden über einen Rest der Formel



(III),

- 10 worin R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup> und R<sup>15</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, OR<sup>7</sup>, wobei R<sup>7</sup> die oben genannte Bedeutung hat, oder C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, oder C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, wobei n die oben genannte Bedeutung hat, bedeuten und  
R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> und R<sup>8</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, oder C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, wobei n die oben genannte Bedeutung hat, -C(O)R<sup>9</sup> mit R<sup>9</sup> gleich ein linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Aryl-, vorzugsweise Phenyl-Rest,  
15 X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-, =C(R<sup>16</sup>)- oder -N(R<sup>17</sup>)- mit R<sup>16</sup> und R<sup>17</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H oder C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> mit den oben genannten Bedeutungen, bedeutet, und S<sub>c1</sub> Wasserstoff oder eine Schutzgruppe ausgewählt aus einer Acyl-, Trityl-, Allyloxycarbonyl-, einer photolabilen oder β-eliminierbaren Schutzgruppe, vorzugsweise eine 20 Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)- oder 4, 4'-Dimethoxytrityl-(DMT)-gruppe,  
oder der Formel (II)



(II),

worin R<sup>1'</sup> gleich H, OH, Hal mit Hal gleich Br oder Cl, ein Rest ausgewählt aus

- 5     $\text{-O-C}(\text{CH}_2)_5\text{-C-O-} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_4 \end{array} \text{-NO}_2$ ,  $\text{-O-C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C-OH}$  oder  $\text{-O-P[N(i-Pr)_2]}$  ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ) mit  
i-Pr gleich Isopropyl, oder  $\text{-O-PH-(=O)(-O-)}$   
R<sup>2'</sup>, R<sup>3'</sup> und R<sup>4'</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, =O,  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$  oder  
OC<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, eine  $\beta$ -eliminierbare Gruppe, vorzugsweise eine Gruppe der Formel  $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{R}^{18}$   
mit R<sup>18</sup> gleich ein Cyano- oder p-Nitrophenylrest oder ein Fluorenylmethyloxycarbonyl-  
10 (Fmoc)-Rest oder  $(\text{C}_n\text{H}_{2n})\text{NR}^{10'}\text{R}^{11'}$ , wobei R<sup>10'</sup>, R<sup>11'</sup>, unabhängig voneinander die oben  
genannte Bedeutung von R<sup>10</sup> bzw. R<sup>11</sup> hat, und  
X', Y' und Z' unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-, =C(R<sup>16</sup>)- oder -  
N(R<sup>17</sup>)- bedeutet, wobei R<sup>16</sup> und R<sup>17</sup> unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung  
von R<sup>16</sup> bzw. R<sup>17</sup> haben, und S<sub>c1'</sub> die oben genannte Bedeutung von S<sub>c1</sub> hat.
- 15    Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die erfindungsgemäße Nucleinsäure aus 3'-  
Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden aufgebaut, wobei weitere Modifikationen, wie z.B. die  
unten näher beschriebenen Konjugate, ebenso von der Erfindung umfaßt werden.
- 20    Die 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleoside sind im allgemeinen 3'-Desoxyribo-, 3'-  
Desoxyarabino-, 3'-Desoxylxo- und/oder 3'-Desoxyxylo-pyranosyl-Nucleoside,  
vorzugsweise 3'-Desoxyribopyranosyl-Nucleoside, wobei der 3'-Desoxypentopyranosyl-Teil  
D-konfiguriert, aber auch L-konfiguriert sein kann.

- 25    Üblicherweise handelt es sich bei den 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden um 3'-  
Desoxypentopyranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin,

adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyltryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -acridin, insbesondere um 3'-Desoxypentopyranosyl-purin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -thymidin, -cytosin, tryptamin, -N-phthalotryptamin oder -uracil.

Unter die Verbindungen fallen auch 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleoside, die als Linker verwendet werden können, d. h. als Verbindungen mit funktionellen Gruppen, die kovalent an Biomoleküle, wie z. B. in ihrer natürlichen Form vorkommende oder modifizierte Nucieinsäuren, wie DNA, RNA aber auch p-NA's, vorzugsweise p-DNA's, binden können.

Beispielsweise fallen hierunter 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleoside, bei denen R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>2'</sup>, R<sup>3'</sup> und/oder R<sup>4'</sup> ein 2-Phthalimidoethyl- oder Allyloxy-Rest bedeutet. Bevorzugt sind gemäß der vorliegenden Erfindung beispielsweise Uracil-basierende Linker, bei denen vorzugsweise die 5-Position des Uracils modifiziert wurde, z. B. N-Phthaloylaminoethyluracil, aber auch Indol-basierende Linker, vorzugsweise Tryptaminderivate, wie z. B. N-Phthaloyltryptamin.

Darüberhinaus werden von der vorliegenden Erfindung 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleoside umfaßt, die ausschließlich am 4'-Sauerstoffatom des 3'-Desoxypentopyranosid-Teils eine Schutzgruppe, vorzugsweise eine säure-, basen-, photolabile oder β-eliminierbare Schutzgruppe, insbesondere eine Tritylgruppe, besonders bevorzugt eine Dimethoxytritylgruppe, tragen.

Folgende Verbindungen stellen bevorzugte Beispiele von Pentopyranosyl-Nucleosiden dar, die in der erfindungsgemäßen Nucieinsäure vorhanden sein können, bzw. für deren Herstellung besonders geeignet sind:

A) [(2',4'-Di-O-Benzoyl)-3'-desoxy-β-ribopyranosyl]-Nucleoside, insbesondere ein [(2',4'-Di-O-Benzoyl)-3'-desoxy-β-ribopyranosyl]-adenin, -guanin, -cytosin, -thymidin, -uracil, -xanthin oder -hypoxanthin, sowie ein N-Benzoyl-2',4'-di-O-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein -adenin, -guanin oder -cytosin, sowie ein N-Isobutyroyl-2',4'-di-O-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein -adenin, -guanin oder -cytosin, sowie ein O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-2',4'-di-O-benzoyl-3'-desoxy-

ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein -guanin; sowie ein O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-2',4'-di-O-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein -guanin.

5 B) 3'-Desoxy-β-ribopyranosyl-Nucleoside, insbesondere ein 3'-Desoxy-β-ribopyranosyladenin, -guanin, -cytosin, -thymidin, -uracil, -xanthin oder hypoxanthin, sowie ein N-Benzoyl-, N-Isobutyroyl-, O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)- oder O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-3'-Desoxy-β-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein -guanin.

10 C) 4'-DMT-3'-desoxy-pentopyranosyl-Nucleoside, vorzugsweise ein 4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein 4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-adenin, -guanin, -cytosin, -thymidin, -uracil, -xanthin oder -hypoxanthin, sowie ein N-Benzoyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein N-Benzoyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin, -guanin oder -cytosin, sowie ein N-Isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein N-Isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin, -guanin oder -cytosin sowie ein O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-guanin, sowie ein O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, insbesondere ein O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-guanin.

15 D) 3'-Desoxy-β-ribopyranosyl-N,N'-dibenzoyl-adenosin oder 3'-Desoxy-β-Ribopyranosyl-N,N'-dibenzoyl-guanosin.

20 25 Als Vorstufe für die Oligonucleotidsynthese eignen sich beispielsweise 4'-DMT-3'-desoxy-pentopyranosyl-Nucleoside-2'-phosphitamid/-H-phosphonat, vorzugsweise ein 4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid-2'-phosphitamid/-H-phosphonat, insbesondere ein 4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-adenin-, -guanin-, -cytosin-, -thymidin-, -xanthin-, -hypoxanthin-, oder -uracil-2'-phosphitamid/-H-phosphonat, sowie ein N-Benzoyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin-, -guanin- oder -cytosin-2'-phosphitamid/-H-phosphonat sowie ein N-Isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin-, -guanin- oder -cytosin-2'-phosphitamid/-H-phosphonat, O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-guanin-, -xanthin-, -hypoxanthin-2'-phosphitamid/-H-phosphonat oder O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-guanin, und für die Kopplung an den festen

- Träger beispielsweise 4'-DMT-3'-desoxy-pentopyranosyl-Nucleoside-2'-succinat, vorzugsweise ein 4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid-2'-succinat, insbesondere ein 4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-adenin-, -guanin-, -cytosin-, -thymidin-, -xanthin-, -hypoxanthin- oder -uracil-2'-succinat sowie ein N-Benzoyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin-, -guanin- oder -cytosin-2'-succinat sowie ein N-Isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-adenin-, -guanin- oder -cytosin-2'-succinat, O-(2-Cyanoethyl)-4'-DMT-3'-desoxy-ribopyranosyl-guanin-2'-succinat sowie ein O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-guanin-2'-succinat.
- 10 Die 3'-Desoxyribopyranosyl-nucleoside können z.B. durch ein Verfahren hergestellt werden, bei dem
- (a) eine gegebenenfalls geschützte Nucleobase mit einer geschützten 3'-Desoxyribopyranose umgesetzt wird,
  - (b) die Schutzgruppen von dem 3'-Desoxyribopyranosyl-Teil des Produktes aus Schritt (a) abgespalten werden, und gegebenenfalls
  - (c) das Produkt aus Schritt (b) an der 4'-Position des 3'-Desoxypentopyranosid geschützt wird.
- 20 In einer besonderen Ausführungsform ist das 3'-Desoxy-pyranosylnucleosid durch eine säurelabile, basenlabile, photolabile  $\beta$ -eliminierbare oder metallkatalysiert abspaltbare Schutzgruppe S<sub>cl</sub>, oder S<sub>cl</sub><sup>-</sup> geschützt.
- 25 Im allgemeinen handelt es sich bei den genannten Schutzgruppen um eine  $\beta$ -eliminierbare Schutzgruppe, vorzugsweise eine Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc) Gruppe, um eine photolabile Schutzgruppe, um eine Acylgruppe, vorzugsweise um eine Acetyl-, Benzoyl-, Nitrobenzoyl- und/oder Methoxybenzoyl-Gruppe, oder um Tritylgruppen, vorzugsweise um eine 4, 4'-Dimethoxytrityl-(DMT)-Gruppe.
- 30 So erfolgt beispielsweise die Einführung einer DMT-Gruppe durch Umsetzen mit DMTCI in Anwesenheit einer Base, z. B. von N-Ethyldiisopropylamin (Hünig-Base), und z. B. von Pyridin, Methylenechlorid oder einem Pyridin/Methylenechlorid-Gemisch bei Raumtemperatur.

Der vorzugsweise anomerenreine Ribopyranosyl-Baustein wird im allgemeinen ausgehend von der 1,2-O-Isopropyliden-5-O-triphenylmethyl- $\alpha$ -D-xylofuranose (1 in Fig. 1) nach

- bekannten Verfahren (W. Sowa, Can. J. Chem., 1968, 46, 1568; Z.J. Witczak et. al. Carbohydrate Research, 1982, 110, 326) aber im allgemeinen mit verbesserten Ausbeuten hergestellt. Analog dem bekannten Verfahren wird 1 (Fig. 1) trityliert und vorzugsweise Natriumhydrid an Stelle von Natronlauge für die Darstellung des Methylxanthogenatesters in 5 der 3'-Position (2 in Fig. 1) verwendet. Nach Entfernen des Methylxanthogenats werden die Trityl- und die Isopropylidenschutzgruppe vorzugsweise mit Trifluoressigsäure an Stelle des in der Literatur beschriebenen 80% Eisessigs abgespalten. Durch diese Modifikationen konnten die Ausbeuten z.T. erheblich verbessert werden.
- 10 In einer weiteren Ausführungsform wird ein Linker gemäß Formel (II), worin  $R^4$  ( $C_nH_{2n}$ )NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> bedeutet und R<sup>10</sup>R<sup>11</sup> über einen Rest der Formel (III) mit der bereits bezeichneten Bedeutung verbunden ist, durch folgendes Verfahren auf vorteilhafte Weise hergestellt:
- (a) eine Verbindung der Formel (II) mit  $R^4$  gleich ( $C_nH_{2n}$ )OS<sub>c3</sub> oder ( $C_nH_{2n}$ )Hal, worin n die oben genannte Bedeutung hat, S<sub>c3</sub> eine Schutzgruppe, vorzugsweise eine Mesylat-Gruppe, und Hal Chlor oder Brom bedeutet, wird mit einem Azid, vorzugsweise in DMF, umgesetzt, anschließend wird
- 15 (b) das Reaktionprodukt aus (a), vorzugsweise mit Triphenylphosphin z. B. in Pyridin reduziert, dann
- 20 (c) das Reaktionsprodukt aus (b) mit einem entsprechenden Phthalimid, z. B. N-Ethoxycarbonylphthalimid, umgesetzt, und
- (d) das Reaktionsprodukt aus (c) mit einer entsprechenden geschützten Pyranose, z. B. 2',4'-Di-O-Benzoyl-3'-desoxyribopyranose, umgesetzt, und schließlich
- 25 (e) werden die Schutzgruppen, z. B. mit Methylat, abgespalten, und
- (f) die weiteren Schritte, wie oben bereits beschrieben, durchgeführt.

Daneben weisen Indolderivate als Linker den Vorzug der Fluoreszenzfähigkeit auf und sind daher für Nanotechnologie-Anwendungen, bei denen es ggf. um den Nachweis kleinsten Substanzmengen geht, besonders bevorzugt. So wurden Indol-1-riboside bei N. N. Suvorov et 30 al., Biol. Aktivn. Soedin., Akad. Nauk SSSR 1965, 60 und Tetrahedron 1967, 23, 4653 bereits beschrieben. Allerdings gibt es kein analoges Verfahren, 3-substituierte Derivate herzustellen. Im allgemeinen erfolgt ihre Herstellung über die Bildung eines Aminals der ungeschützten Zuckerkomponente und einem Indolin, welches dann durch Oxidation in das Indol-1-ribosid übergeführt wird. Beschrieben wurden z. B. Indol-1-glucoside und -1-arabinoside (Y. V.

Dobriyin et al, Khim.-Farm. Zh. 1978, 12, 33), deren 3-substituierte Derivate meist über Vielsmeier-Reaktion hergestellt wurden. Dieser Weg der Einführung von Aminoethyl-Einheiten in 3-Position des Indols ist für eine industrielle Anwendung jedoch zu aufwendig.

- 5 In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird daher ein Linker gemäß Formel (I), worin X und Y unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =C(R<sup>16</sup>) mit R<sup>16</sup> gleich H oder C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub> und Z =C(R<sup>16</sup>)- mit R<sup>16</sup> gleich (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> durch folgendes Verfahren auf vorteilhafte Weise hergestellt:
- (a) das entsprechende Indolin, z. B. N-Phthaloyltryptamin, wird mit einer Pyranose, z. B. D-
- 10 3'-Desoxyribose, zum Nucleosiddiol umgesetzt, dann werden
- (b) die Hydroxylgruppen des Pyranosyl-Teils des Produktes aus (a) vorzugsweise mit Acylgruppen, z. B. mittels Essigsäureanhydrid, geschützt, anschließend wird
- (c) das Produkt aus (b), z. B. durch 2,3-Dichlor-5,6-dicyanoparachinon, oxidiert, und
- (d) die Hydroxyl-Schutzgruppen des Pyranosyl-Teils des Produktes aus (c) werden z. B.
- 15 mittels Methylat abgespalten und anschließend werden
- (e) die weiteren Schritte, wie oben bereits beschrieben, durchgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform werden die 4'- bzw. 2'-geschützten, 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleoside in einem weiteren Schritt phosphoryliert oder an eine feste 20 Phase gebunden.

Die Phosphitylierung erfolgt beispielsweise durch Phosphorigsäurecyanoethylester-diisopropyl-amidchlorid in Anwesenheit einer Base, z. B. N-Ethyl-diisopropylamin oder durch Phosphortrichlorid und Imidazol bzw. Tetrazol und nachfolgender Hydrolyse unter Basenzusatz. Im ersten Fall ist das Produkt ein Phosphoramidit und im zweiten Fall ein H-Phosphonat. Die Bindung eines geschützten erfindungsgemäßen Pentopyranosyl-Nucleosids an eine feste Phase, z. B. „long-chain-alkylamino-controlled pore glass“ (CPG, Sigma Chemie, München) kann beispielsweise über einen Succinoyl-Linker erfolgen.

30 Die erhaltenen Verbindungen können für die Herstellung der erfindungsgemäßen 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäuren dienen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure, mit folgenden Schritten:

- (a) in einem ersten Schritt wird ein geschütztes 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid, wie oben bereits beschrieben, an eine feste Phase gebunden wird und
- (b) in einem zweiten Schritt wird das gemäß Schritt (a) an eine feste Phase gebundene 4'-geschützte 3'-Desoxypentopyranosylnukleosid um ein 2'-phosphityliertes 4'-geschütztes 3'-
- 5 Desoxypentopyranosyl-Nucleosid verlängert und bei Einsatz von Phosphoramiditen anschließend z. B. durch eine wäßrige Jodlösung oxidiert wird, und
- (c) Schritt (b) solange mit gleichen oder unterschiedlichen phosphitylierten 3'-, 4'-geschützten 3'-Desoxypentopyranosyl -Nucleosiden wiederholt, bis die gewünschte 3'-Desoxypentopyranosyl -Nucleinsäure vorliegt.
- 10 Bei Einsatz von H-Phosphonaten erfolgt die Oxidation zu den entsprechenden Phosphorsäurediestern im allgemeinen am Ende der Reaktionskette z.B. durch eine wäßrige Jodlösung.
- 15 Als Kupplungsreagenz bei Einsatz von Phosphoramiditen eignet sich besonders Pyridinium-Hydrochlorid, da im Gegensatz zu üblicherweise verwendeten Kupplungsreagenzien keine Umkristallisation des Kupplungsreagenzes, keine Verstopfung der Kupplungsreagenz-Leitungen und eine wesentlich schnellere Kondensation erfolgt.
- 20 Als Kupplungsreagenz beim Einsatz von H-Phosphonaten eignen sich besonders Arylsulfonylchloride, Diphenylchlorophosphat, Pivaloylchlorid oder Adamantoylchlorid.
- Ein wesentlicher Vorteil der H-Phosphonatmethode ist, daß keine Phosphatschutzgruppen benötigt werden. Die Acylschutzgruppen der Basen können z.B. durch wäßrigen Ammoniak abgespalten werden. Bei Verwendung des 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-Restes als Schutzgruppe der O<sup>6</sup>-Position des Guanins kann dieser beispielsweise problemlos durch eine ca. 40minütige Behandlung mit 1M DBU entfernt werden.
- 25 Weiterhin ist es von Vorteil, daß keine schutzgruppenabspaltenden Hydrazinolyse von Oligonukleotiden notwendig ist, und somit keine Ringöffnung, vor allem bei Uracil und Thymin, zu befürchten ist. Die Cyanoethylreste können gemeinsam mit den Acylschutzgruppen der Basen durch wäßrigen Ammoniak abgespalten werden. Bei der Verwendung des 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-Restes als Schutzgruppe der O<sup>6</sup>-Position des

Guanins kann der Rest ohne Probleme durch ca. 40 minütige Behandlung mit 1M DBU entfernt werden.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform können in Schritt (a) und/oder Schritt (b) auch  
5 Pentofuranosyl-nucleoside, z. B. das in ihrer natürlichen Form vorkommende Adenosin,  
Guanosin, Cytidin, Thymidin und/oder Uracil, eingebaut werden, was z. B. zu einer  
gemischten p-DNA-DNA bzw. p-DNA-RNA führt.

p-NA's und insbesondere die p-DNA's bilden untereinander stabile Duplices und paaren im  
10 allgemeinen nicht mit den in ihrer natürlichen Form vorkommenden DNA's und RNA's.  
Diese Eigenschaft macht p-NA's zu bevorzugten Paarungssystemen.

Solche Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht kovalenter Wechselwirkung,  
die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften  
15 bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflußt  
werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch  
als „molekularer Klebstoff“ für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern  
zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R.  
L. Letsinger, et al., Nature 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature 1996, 382, 609-11].  
20 Folglich eignen sich die p-NA's auch für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie,  
beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie  
mikroelektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte  
Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. für den  
(kombinatorischen) Aufbau von Proteinassemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson,  
25 W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504], da p-NA's Paarungssysteme  
bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt  
sich daher gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit,  
funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder DNA/RNA-Abschnitte, mit  
einem p-NA-Code zu versehen, der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe  
30 z. B. WO93/20242).

Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung einer erfindungsgemäßen 3'-  
Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere eines  
Therapeutikums, Diagnostikums und/oder elektronischen Bauteils.

Ein Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, kann zum nicht-kovalenten Verbinden (Linken) mit einem anderen Biomolekül, z. B. DNA oder RNA, verwendet werden, wenn beide Biomoleküle Abschnitte enthalten, die aufgrund komplementärer Sequenzen von Nucleobasen durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken aneinander binden können. Derartige Biomoleküle finden z. B. in analytischen Systemen zur Signalamplifizierung Verwendung, wo ein in seiner Sequenz zu analysierendes DNA-Molekül über einen solchen nicht-kovalenten DNA-Linker zum einen an einen festen Träger immobilisiert, und zum anderen an ein signalverstärkendes branchedDNA-Molekül (bDNA) gebunden werden soll (siehe Fig. 3 in S. Urdea, Bio/Technol. 1994, 12, 926 oder US-Patent Nr. 5,624,802). Ein wesentlicher Nachteil der zuletzt beschriebenen Systeme ist, daß sie den Verfahren zur Nucleinsäure-Diagnostik durch Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (K. Mullis, Methods Enzymol. 1987, 155, 335) hinsichtlich der Empfindlichkeit bis jetzt unterlegen sind. Das ist u. a. darauf zurückzuführen, daß die nicht-kovalente Bindung vom festen Träger an das zu analysierende DNA-Molekül ebenso wie die nicht-kovalente Bindung des zu analysierenden DNA-Moleküls nicht immer spezifisch erfolgt, wodurch es zu einer Vermischung der Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ kommt. Die Verwendung von p-NA's als orthogonales Paarungssystem, welches nicht in das DNA- bzw. RNA-Paarungsgeschehen eingreift, löst dieses Problem auf vorteilhafte Weise, wodurch die Empfindlichkeit der beschriebenen analytischen Verfahren deutlich erhöht werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Konjugat enthaltend ein erfindungsmäßiges 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid der Formel (I) oder (II) und ein Biomolekül.

Unter Biomeolekül versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine natürlich vorkommende oder eine von einer natürlich vorkommenden Substanz abgeleitete Substanz.

Konjugate sind im Sinne der vorliegenden Erfindung kovalent gebundene Hybride aus p-NA's und anderen Biomolekülen, vorzugsweise ein Peptid, Protein oder eine Nucleinsäure, beispielsweise ein Antikörper oder ein funktioneller Teil davon oder eine in ihrer natürlichen Form vorkommende DNA und/oder RNA. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige

Fv-Fragmente (scFv; Bird et al. (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041).

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um p-DNA/DNA- bzw p-DNA/RNA-Konjugate.

Konjugate werden dann vorzugsweise verwendet, wenn die Funktionen „Sequenzerkennung“ und „nicht-kovalente Bindung“ in einem Molekül realisiert werden müssen, da die erfindungsgemäßen Konjugate zwei zueinander orthogonale Paarungssysteme enthalten.

10

Für die Herstellung von Konjugaten sind sowohl sequentielle als auch konvergente Verfahren geeignet.

In einem sequentiellen Verfahren wird z. B. nach erfolgter automatisierter Synthese eines p-RNA-Oligomeren direkt am gleichen Synthesizer - nach Umstellung der Reagenzien und des Kupplungsprotokolls - z. B. ein DNA-Oligonukleotid weitersynthetisiert. Dieser Vorgang lässt sich auch in umgekehrter Reihenfolge durchführen.

In einem konvergenten Verfahren werden z. B. p-RNA-Oligomere mit Aminoterminalen-Linkern und z. B. DNA-Oligomere mit z. B. Thiol-Linkern in getrennten Vorgängen synthetisiert. Anschließend erfolgt vorzugsweise eine Jodacetylierung des p-DNA-Oligomeren und die Kupplung der beiden Einheiten nach literaturbekannten Protokollen (T. Zhu et al., Bioconjug. Chem. 1994, 5, 312).

25 Konvergente Verfahren erweisen sich aufgrund ihrer Flexibilität als besonders bevorzugt.

Unter dem Begriff Konjugat im Sinne der vorliegenden Erfindung sind auch sogenannte Arrays zu verstehen. Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspecies, die speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., Nature 1993, 364, 555) und Nucleinsäure-Arrays (Southern et al. Genomics 1992, 13, 1008; Heller, US-Patent Nr. 5,632,957). Eine höhere Flexibilität dieser Arrays kann dadurch erreicht werden, daß die Erkennungsspecies an codierende Oligonucleotide gebunden werden und die zugehörigen, komplementären Stränge an bestimmte Positionen auf einem festen Träger. Durch Aufbringen der codierten Erkennungsspecies auf den „anti-codierten“ festen Träger und Einstellung von

Hybridisierungsbedingungen werden die Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen nicht-kovalent gebunden. Dadurch können verschiedene Typen von Erkennungsspecies, wie z. B. DNA-Abschnitte, Antikörper, nur durch Anwendung von Hybridisierungsbedingungen gleichzeitig auf einem festen Träger angeordnet werden (siehe Fig. 4.). Voraussetzung hierzu sind aber äußerst starke, selektive - um die codierenden Abschnitte möglichst kurz zu halten - und mit natürlicher Nucleinsäure nicht interferierender Codons und Anticodons notwendig. p-NA's, vorzugsweise p-DNA's eignen sich hierzu in besonders vorteilhafter Weise.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren, mit denen Erkennungsspecies, bevorzugt natürliche DNA- oder RNA-Stränge und Proteine, dabei bevorzugt Antikörper oder funktionelle Teile von Antikörper, durch p-NA-Abschnitte, bevorzugt p-DNA-Abschnitte, eindeutig codiert werden. Diese können dann gemäß Fig. 4. mit den zugehörigen Codons auf einem festen Träger hybridisiert werden. Damit kann auf einem festen Träger, der in Form eines Arrays mit Codons ausgestattet ist, nur durch Einstellung von Hybridisierungsbedingungen mit immer neuen Kombinationen von Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen immer neue, diagnostisch nützliche Arrays aufgebaut werden. Wird dann der Analyt, beispielsweise eine biologische Probe wie Serum o. ä. aufgebracht, dann werden die zu detektierenden Species in einem bestimmten Muster auf dem Array gebunden, welches dann indirekt (z. B. durch Fluoreszenzmarkierung der Erkennungsspecies) oder direkt (z. B. durch Impedanzmessung am Anknüpfungspunkt der Codons) registriert wird. Dann wird die Hybridisierung durch geeignete Bedingung aufgehoben (Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge) so daß wieder nur der Träger mit den Codons zurückbleibt. Dieser wird dann erneut mit anderen Erkennungsspecies beladen und wird z. B. für den gleichen Analyten für die Ermittlung eines anderen Musters verwendet. Die immer neue Anordnung von Erkennungsspecies im Array-Format und die Verwendung von p-NA's als Paarungssysteme ist gegenüber anderen Systemen, siehe z. B. WO 96/13522 (s. 16, unten), besonders vorteilhaft.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher insbesondere auch auf ein Diagnostikum und/oder einen elektronischen Bauteil enthaltend ein erfundungsgemäßes Konjugat, wie oben bereits näher beschrieben.

Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

**BESCHREIBUNG DER FIGUREN**

5 Fig. 1 zeigt die Synthese der Zuckerkomponente, wobei T Triphenylmethyl (Trityl) bedeutet.

Fig. 2 zeigt den Syntheseweg zu den monomeren Bausteinen, wobei B eine in der Natur vorkommende oder synthetische Nucleobase bedeutet.

10

Fig. 3 zeigt einen Ausschnitt aus der Struktur von RNA in ihrer natürlich vorkommenden Form (links) und eine p-DNA (rechts).

15 Fig. 4 zeigt schematisch eine Anordnung von immobilisierten Erkennungsstrukturen (Arrays) auf einem festen Träger.

**BEISPIELE**

20 Beispiel 1

*1,2-O-Isopropyliden-3-O-[(methylthio)thiocarbonyl]-5-O-trityl- $\alpha$ -D-xylofuranose (3)*

444,3 g (1,027 mol) 1,2-O-Isopropyliden-5-O-trityl- $\alpha$ -D-xylofuranose (2) wurden in 1000 ml abs DMF gelöst. Unter Kühlung, KPG-Rührung, N<sub>2</sub>-Atmosphäre und leichtem N<sub>2</sub>-Strom bei 0-5° C wurden portionsweise innerhalb von 1 h 29,58 g (1,232 mol) NaH zugegeben. Nach beendeter NaH Zugabe wurde noch weitere 15 Minuten unter Kühlung gerührt. Man rührte noch eine weitere Stunde ohne Kühlung bis kein Wasserstoff mehr entsteht. Die Innentemperatur der klaren Lösung betrug 12° C. Nun wurden 57,7 ml (1,027 mol) Schwefelkohlenstoff innerhalb von 20 Minuten zugetropft. Die Reaktionstemperatur wurde durch Kühlung bei 20-25° C gehalten. Nach 30 Minuten wurden 77,4 ml (1,027 mol) Jodmethan innerhalb von 20 Minuten unter leichter Kühlung langsam zugegeben (T=20-25°C). Während der Reaktion mußten weitere 500 ml DMF zugegeben werden. Nach weiteren 2 h wurde der Ansatz auf 2 l Eiswasser und 1,5 l Dichlormethan gegeben und

ausgeführt. Die org. Phase wurde mit 4 x 0,7 l Wasser extrahiert, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und eingeengt. Man erhielt 610,5 g rohes Produkt welches direkt weiter umgesetzt wurde.

5 DC (Kieselgel, Aceton/Heptan 1:4):  $R_f$ =0,30.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,32, 1,56 ( 2s, 3H, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 2,41 ( s, 3H, S- $\text{CH}_3$ ), 3,32 (dd, 1H, H-C(5)), 3,47 (dd, 1H, H-C(5)), 4,54 (m, 1H, H-C(4)), 4,64 (m, 1H, H-C(2)), 5,89  
10 (m, 1H, H-C(3)), 6,09 (d, J = 3 Hz, 1H, H-C(1)), 7,18-7,43 (m, 15H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ).

### Beispiel 2

15

#### *3-Desoxy-1,2;4-Tri-O-Benzoyl- $\alpha$ -D-erythro-pentose (6)*

4,16 g (1 mmol) 3-Desoxy-1,2-O-Isopropyliden-5-O-trityl- $\alpha$ -D-xylofuranose (4) wurden in 20,0 ml Dichlormethan gelöst. Unter Röhren bei RT wurden 20,0 ml Wasser und 2,0 ml Trifluoressigsäure zugegeben und 17 h bei RT gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde 2 x mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert und etwas eingeengt. Der Rückstand wurde noch 2x in jeweils 20 ml Wasser gelöst und eingeengt. Der Rückstand wurde wieder in 20 ml Wasser gelöst, mit 2,0 g stark basischem Ionentauscher 15 Minuten verrührt (pH-Wert 7-8), der Ionentauscher abfiltriert und zur Trockne eingeengt. Das leicht gelbliche Öl wurde mit 27 ml abs. Pyridin/Dichlormethan 2:1 versetzt, 2,0 g Molsieb 4 Å addiert und 1 h unter Argon gerührt. Nun wurden 6,1 ml Benzoylchlorid in 6,1 ml abs. Pyridin bei -30°C zugetropft. Nach 1 Stunde ließ man auf Raumtemperatur kommen und rührte über Nacht. Nach der Zugabe von 2 ml MeOH wurde eingeengt, der feste Rückstand mit Toluol koevaporiert, abermals in Toluol aufgenommen, verrührt und abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeengt und über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 4 x 33 cm) mit einem linearen Gradienten von Heptan zu Heptan/EtOAC 2:1 in 4l gereinigt. Die erhaltenen Produktfraktionen wurden eingeengt, in 30 ml Diethylether verrührt und der Feststoff abgesaugt. Man erhielt 1,07 g (25%) eines weißen Feststoffs.

**18**

DC (Kieselgel, Dichlormethan/MeOH 4:1):  $R_f = 0.45$ .

DC (Kieselgel, Heptan/EtOAc 2:1):  $R_f = 0.35$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

5    2,51 (m,2H,H-C(3)), 4,01 (dd,1H,H-C(5)), 4,21 (dd,1H,H-C(5)), 5,17 (m,2H, H-C(4), H-C(2)), 6,38 (d, J=2 Hz,1H,H-C(1)), 7,18-7,95 (m,16 H,H<sub>arom</sub>), 7,40 (m,4H,H<sub>arom</sub>), 7,52 (m,1H,H<sub>arom</sub>), 7,95 (m,6H,H<sub>arom</sub>).

<sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

10   27,28 (s, C(3)), 63,45 (s, C(5)), 65,56 (s, C(4)), 66,24 (s, C(2)), 91,202 (s, C(1)), 128,2-129,9 (m, 12C<sub>arom</sub>), 133,07 (s, C<sub>arom, para</sub>), 133,22(s, C<sub>arom, para</sub>), 133,71 (s, C<sub>arom, para</sub>), 164,22 (s, C=O), 165,60 (s, C=O), 166,06 (s, C=O).

15   Beispiel 3

*Synthese des 1-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribopyranosyl}-thymin-2'-O-(2-cyanoethyl-N,N-disopropyl)-phosphoramidits (10a)*

20

Synthese des 1-(3'-Desoxy-2,4-Di-O-benzoyl-β-D-ribopyranosyl)-thymins (7a)

1,0 g (2,24 mmol) 3'-Desoxy-1,2,4-Tri-O-benzoyl-ribopyranose (6) und 283 mg (2,24 mmol)  
 25   Thymin wurden in 11,0 ml Acetonitril suspendiert und auf 60°C erwärmt. Zu dieser Mischung wurden innerhalb von 10 Minuten 957 mg (4,7 mmol) N,O-Bis-(trimethylsilyl ) acetamid (BSA) mit einer Spritze zugetropft und 15 min bei 60°C belassen. Zu der entstandenen Lösung addiert man 2,02 g (9,07 mmol) Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester (=TMS-triflat) innerhalb von 45 min und röhrt 2 h bei 60°C nach. Das  
 30   Reaktionsgemisch lässt man auf RT abkühlen, verdünnt mit EtOAc und extrahiert gegen verdünnte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Die EtOAc-Phase wurde nochmals mit Wasser extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Durch Chromatographie an Kieselgel 60 (3 x 28 cm) mit einem linearen Gradienten von Heptan bis Heptan/EE = 1/1 in 4l, erhielt man nach Einengen der produkthaltigen Fraktionen einen farblos amorphen Feststoff, der in 20 ml

Diethylether aufgenommen und verrührt wurde. Es resultierten 1.0 g (99%) des gewünschten Produkts.

DC (Kieselgel, EtOAc/Heptan 1:1):  $R_f = 0.27$ .

5

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

1,94 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,12 (dd, 1H,  $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(3')$ ), 2,93 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(3')$ ), 3,70 (t, 1H,  $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(5')$ ),  
 4,40 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(5')$ ), 5,25 (m, 1H, H-C(4')), 5,32 (m, 1H, H-C(2')), 5,93 (d,  $J=9,3$  Hz, 1H,  
 H-C(1')), 7,22 (d, 1H, H-C(6)) 7,38-7,50 (m, 4H, 3,5-H<sub>arom</sub>), 7,54-7,63 (m, 2H, 4-H<sub>arom</sub>), 7,94-  
 10 8,04 (m, 4H, 2,6-H<sub>arom</sub>), 8,26 (bs, 1H, H-N(3)).

$^{13}\text{C}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 12,52 ( $\text{CH}_3$ ), 165,10 (C=O), 34,63 (C(3')), 65,85 (C(4')), 67,64  
 (C(2')), 69,16 (C(5')), 82,22 (C(1')), 111,94 (C(5)), 128,50 (C<sub>arom</sub>), 128,54 (C<sub>arom</sub>), 128,72  
 (C<sub>arom</sub>), 129,21 (C<sub>arom</sub>), 129,71 (C<sub>arom</sub>), 129,85 (C<sub>arom</sub>), 133,51 (C<sub>arom</sub>), 133,63 (C<sub>arom</sub>), 134,66  
 (C(6)), 150,69 (C(2)), 163,31 (C(4)), 165,34 (C=O).

### Synthese des 1-(3'-Desoxy-ribopyranosyl)-thymins (8a)

20

807 mg (1,79 mmol) 1 wurden in 20 ml methanolischem Ammoniak 48 h bei RT gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung eingeengt, der feste Rückstand in EtOAc/MeOH = 9:1 verrührt und abgesaugt. Man erhielt 345 mg (80%) eines weißen kristallinen Feststoffs. Die Mutterlauge wurde eingeengt und über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 3 x 15 cm) mit einem linearen Gradienten von EtOAc bis EtOAc/MeOH = 9:1 in 31 gereinigt. Man erhielt weitere 70 mg (16%) des gewünschten Produkts. Insgesamt wurden 415 mg (96%) von 2 isoliert.

DC: (Kieselgel, EtOAc/MeOH 9:1)  $R_f = 0,28$

30

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD): 1,48 (q, 1H,  $\text{H}_b(3')$ ), 1,80 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,37 (m, 1H,  $\text{H}_b(3')$ ),  
 3,20 (t, 1H,  $\text{H}_b(5')$ ), 3,24 (m, 2H, OH), 3,70 (m, 1H, H(4')), 3,75 (m, 1H, H(2')), 3,90 (ddd,  
 1H,  $\text{H}_a(5')$ ), 5,22 (d, 1H,  $J=9$  Hz, H(1')), 7,37 (d, 1H, H(6)).

Synthese des 1-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- $\beta$ -D-ribopyranosyl}-thymins (9a)

5

320 mg (1,32 mmol) 8a wurden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre in 6 ml abs. Dichlormethan/Pyridin 1:2 gelöst, 1g Molsieb 4 Å addiert und der Ansatz 15 min bei RT gerührt. Nun kühlte man auf -10°C ab, addierte 0,47 ml Diisopropylamin und 0,76 g (2,24 mmol) Dimethoxytrityl-chlorid (DMTCI) ließ auf RT kommen. Es wurde über Nacht gerührt. Nochmalige Zugabe von 0,38 g (1,12 mmol) DMTCI in 2 ml abs. Dichlormethan und röhren über Nacht brachte die Reaktion zur Vollständigkeit. Der Ansatz wurde vom Molsieb abgesaugt, auf halbgesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegossen und mit Methylenchlorid extrahiert. Die Methylenchloridphase wurde 2x mit Wasser ausgeschüttelt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeengt. Es wurde über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60; 3 x 20 cm) und einem Gradienten (2 l n-Heptan und 2 l n-Heptan/ EE = 1/1 als linearer Gradient) gereinigt. Zum Schluß wurde die Säule mit Heptan/EtOAc/MeOH 5:5:1 gewaschen, die produkthaltigen Fraktionen einrotiert, in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff verrührt und wiederum eingeengt. Der Rückstand wurde an der HV über Nacht getrocknet. Man erhielt 352 mg (32%) des zweifach tritylierten Produkts 12a. Die polaren Fraktionen wurden noch einmal über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 3 x 25 cm) mit einem linearen Gradienten von Dichlormetan bis Dichlormethan/MeOH 19:1 in 4 l aufgetrennt. Man isolierte 50 mg (7%) an 1-{3'-Desoxy-2'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- $\beta$ -D-ribopyranosyl}-thymin 11a und 293 mg (41%) 9a.

DC (Kieselgel):

- 25 9a (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) R<sub>f</sub>=0,26  
11a (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) R<sub>f</sub>=0,29  
12a (EtOAc/Heptan 4:1) R<sub>f</sub>=0,49

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,20 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(3')), 2,92 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(3')), 3,11 (m, 2H, H(4'), H<sub>ax</sub>-C(5')), 3,34 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(5')), 3,64 (m, 1H, H(2')), 3,71 (d, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 5,26 (d, 1H, J=9 Hz, H(1')), 6,76 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 6,89 (d, 1H, H(6)), 7,10-7,44 (m, 9H, H<sub>arom</sub>), 9,14(bs, 1H, H-N(3))

Synthese des 1-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- $\beta$ -D-ribopyranosyl}-thymin-2'-O-(2-cyanoethyl-N,N-disopropyl)-phosphoramidits (10a)

218 mg (0,4 mmol) 1-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- $\beta$ -D-ribopyranosyl}-thymin 9a wurden in 2,0 ml abs Dichlormethan gelöst und mit 155 mg (1,2 mmol) N-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Bei RT. wurden nun 237 mg (1,0 mmol) Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)diisopropyl-amidchlorid innerhalb von zwei Minuten zugetropft. Der Ansatz rührte 3 h bei RT., wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf 40 ml verdünnt und mit 50 ml Phosphatpuffer (pH=7) extrahiert, die org. Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeengt. Das Rohprodukt wurde über eine Kieselgelsäule (3 x 15 cm) mit einem linearen Gradienten von EE/Heptan = 1:2 bis EE in 4l gereinigt. Man erhielt 266 mg (89%) eines farblosen Harzes.

DC (Kieselgel, Heptan/EtOAc 4:1): R<sub>f</sub> = 0,47/0,54

15

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz in CDCl<sub>3</sub>):

1,10 (m, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 1,83 (m, 1H, H<sub>ax</sub>-C(3')); 1,88 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-C(5)); 2,21 (m, 1H, H<sub>eq</sub>-C(3')); 2,41-2,61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 2,98 (m, 1H, H<sub>eq</sub>-C(5')); 3,19 (m, 1H, H<sub>ax</sub>-C(5')); 3,35-3,80 (m, 6H, CH<sub>2</sub>OP, H-C(4'), H-C(2'); 2xCH); 3,8 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub>); 5,41 (d, J=8,86 Hz, 1H, H-C(1')); 6,8 (m, 4H, H<sub>DMT</sub>); 6,97 (m, 1H, H-C(6)); 7,20-7,52 (m, 9H, H<sub>arom</sub>); 8,25 (s, 1H, H-N(3)).

Beispiel 4

25

Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- $\beta$ -D-ribopyranosyl}-adenins-2'-O-(2-cyanoethyl-N,N-disopropyl)-phosphoramidits (10b)

30 Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-(3'-desoxy-2,4-di-O-benzoyl-ribopyranosyl)-adenins (7b)

2,23 g (5 mmol) 6 und 1,20 g (5 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyladenin wurden unter Argonatmosphäre in 35 ml abs. Acetonitril vesetzt und 15 Minuten gerührt. Es wurde auf leichten Rückfluß erhitzt. Zu dieser Suspension wurde innerhalb von 20 Minuten 2,14 g (10,5 mmol) BSA zugetropft und 15 min bei 68°C gerührt. Nun wurden innerhalb 5 Minuten 4,7 g (18 mmol) Zinntetra-

chlorid zugetropft und 1h am Rückfluß gerührt. Man ließ auf RT kommen, goß auf 150 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg und extrahierte gegen 100 ml EtOAc. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit 150 ml EtOAc gewaschen. Die org. Phase wurde nochmals mit 100 ml Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Man reinigte 5 über eine Kieselgelsäule (3 x 26 cm) mit einem Gradienten (2l EtOAc/Heptan 2:1 und 2l EtOAc linearer Gradient), vereinigte die produkthaltigen Chargen und isolierte 2,7 g (96 %) eines weißen Feststoffs.

DC (Kieselgel): 4 (EtOAc): R<sub>f</sub> = 0,40.

10

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 2,16 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(3')), 2,97 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(3')), 3,76 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(5')), 4,41 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(5')), 5,38 (m, 1H, H(4')), 5,62 (m, 1H, H(2')), 5,98 (d, 1H, J = 8,92 Hz, H(1')), 7,22-8,0 (m, 15H, H<sub>arom</sub>), 8,21 (s, 1H, H(8)), 8,74 (s, 1H, H(2)), 8,91 (bs, 1H, NH).

15

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 34,57 (C(3')), 65,80 (C(4')), 68,86 (C(2')), 69,13 (C(5')), 82,67 (C(1')), 122,53 (C(6)), 127,76-133,62 (12 x C(arom)), 140,62 (C(8)), 149,63 (C(6)), 151,91 (C(4)), 153,03 (C(2)), 164,44 (C=O an N-C(6)), 164,77 (C=O), 165,32 (C=O).

20

#### Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-(3'-Desoxy- $\beta$ -D-ribopyranosyl)-adenins (8b)

280 mg (0,5 mmol) 7b wurden in 7 ml THF/MeOH/H<sub>2</sub>O 5:4:1 gelöst und, auf -5°C abgekühlt 25 und 2,22 ml 32 %ige NaOH-Lösung in THF/MeOH/H<sub>2</sub>O 5:4:1 langsam zugegeben, so daß die Temp. unter 0°C blieb. Man rührte 20 min unter Kühlung, versetzte mit 400 mg (7,5 mmol) Ammoniumchlorid und ließ die Lösung auf RT kommen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, der Rückstand in 20ml MeOH gelöst, auf 10 g Kieselgel aufgezogen und chromatographisch über eine Kieselgelsäule (3 x 12 cm mit 1 l Dichlormethan und 2 l 30 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH = 4/1 als linearer Gradient) gereinigt. Es wurden 157 mg (88%) des farblosen Feststoffs 8b isoliert.

DC (Kieselgel): 5 (EtOAc/MeOH 4:1 ) R<sub>f</sub> = 0,34

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, MeOD): 1,58 (q, 1H, H<sub>ax</sub>(3')), 2,45 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(3')), 3,33 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(5')), 3,87 (m, 1H, H(4')), 3,97 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(5')), 4,25 (m, 1H, H(2')), 5,40 (d, 1H, J=9,2 Hz, H(1')), 7,30-8,02 (m, 5H, H<sub>arom</sub>), 8,47 (s, 1H, H(8)), 8,63 (s, 1H, H(2)).

5

Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribopyranosyl}-adenins (9b)

- 10 In einer Argonatmosphäre wurden 1,02 g (2,87 mmol) 8b in 9,0 ml abs Pyridin gelöst, 1,56 g (12 mmol) N-Ethyldiisopropylamin und 1,0 g Molsieb 4 Å addiert und 30 min bei RT gerührt. Nun wurde auf -10°C abgekühlt, 2,2 g (6,49 mmol) DMTCI in 5,0 ml abs. Chloroform gelöst innerhalb von 30 min zugetropft. Der Versuch rührte bei RT über Nacht. Nach 22 h wurden wiederum 200 mg (0,59 mmol) DMTCI und 2 h darauf weitere 430 mg (1,27 mmol) DMTCI
- 15 in fester Form zugegeben. Nach nochmals 22 h bei RT wurde der Ansatz auf 100 ml einer halbgesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gegossen, mit 100 ml Methylenchlorid versetzt und extrahiert. Die org. Phase wurde noch 2 x mit je 100 ml H<sub>2</sub>O rückextrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingeengt. Reinigung über eine Kieselgelsäule(3 x 25 cm) mit einem Gradienten (2l EtOAc/Heptan 2:1 und 2l EtOAc mit einem linearen Gradienten) lieferte: 520 mg (27,5 %)
- 20 9b, 430 mg (23%) Mischung aus 9b und 11b, 370 mg (13,4 %) 12b und 370 mg (20%) des Edukts.

DC (Kieselgel, EtOAc):

9b: R<sub>f</sub> = 0.29

25 11b: R<sub>f</sub> = 0.12

12b: R<sub>f</sub> = 0.55

<sup>1</sup>H-NMR ( 500 MHz in CDCl<sub>3</sub>):

- 30 1,92 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(3')), 2,42 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(3')), 2,99 (m, 1H, H<sub>eq</sub>(5')), 3,21 (m, 1H, H<sub>ax</sub>(5')), 3,79 (d, 6H, 2 x OCH<sub>3</sub>), 3,84 (m, 1H, H(4')), 4,13 (m, 1H, H(2')), 5,17 (bs, 1H, OH), 5,32 (d, 1H, J=8,7 Hz, H(1')), 6,86 (dd, 4H, H<sub>arom</sub>), 7,20-7,75 (m, 12H, H<sub>arom</sub>), 7,96 (m, 3H, 1H(8), 2H<sub>arom</sub>), 8,54 (s, 1H, H(2)), 8,94 (bs, 1H, NH).

<sup>13</sup>C-NMR ( 500 MHz in CDCl<sub>3</sub> )

39,13 (C(3')), 55,26 (2 x OCH<sub>3</sub>), 66,59 (C(4')), 67,72 (C(2')), 70,76 (C(5')), 86,69 (C<sub>tert</sub> Trityl), 86,93 (C(1')), 113,31 (2C<sub>arom</sub>), 113,34 (2C<sub>arom</sub>), 121,8 (C(5)), 127,04 - 136,74 (11C<sub>arom</sub>), 141,74 (C(8)), 145,51 (C<sub>arom</sub>), 148,85 (C(6)), 151,56 (C(2)), 158,74 (2C<sub>arom</sub>), 164,61 (C=O).

5

*Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-Desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribopyranosyl}-adenins-2'-O-(2-cyanoethyl-N,N-disopropyl)-phosphoramidits (10b)*

380 mg (0,58 mmol) N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribopyra-nosyl}-adenin 9b wurden in 2,0 ml abs Dichlormethan gelöst und mit 224 mg (1,73 mmol) N-Ethyldiisopropylamin versetzt. Bei RT wurden nun 342 mg (1,44 mmol) Phosphorigsäure-mono-(2-cyanethylester)diisopropylamid-chlorid innerhalb von zwei Minuten zugetropft. Der Ansatz rührte 3 h bei RT, wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> auf 40 ml verdünnt und mit 50 ml Phosphatpuffer (pH=7) extrahiert. Die org. Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, 15 filtriert und eingeengt. Man reinigte Kieselgelsäule (3 x 15 cm) mit einem linearen Gradienten von EtOAC/Heptan (1:2) bis EtOAc/Heptan (4:1) als lineraren Gradienten. Es wurden 400 mg (80%) eines gelblichen Schaumes erhalten.

20 DC (Kieselgel, EtOAc/Heptan 4:1): R<sub>f</sub> = 0,38

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz in CDCl<sub>3</sub>):

1,05 (m, 6H, 2xCH<sub>3</sub>); 1,87 (m, 1H, H<sub>ax</sub>-C(3')); 2,23 (m, 1H, H<sub>eq</sub>-C(3')); 2,32 & 2,55 (2 x m, 2H, CH<sub>2</sub>CN); 3,05-3,70 (m, 6H, 2xCH, CH<sub>2</sub>OP, 2xH-C(5')); 3,79 (m, 6H, 2xOCH<sub>3</sub>); 3,90 (m, 1H, H-C(4')); 4,12 (m, 1H, H-C(2')); 5,47 (2xd, J=8,87Hz, 1H, H-C(1')); 6,85 (m, 4H, H<sub>DMT</sub>); 7,20-7,65 (m, 13 H, H<sub>arom</sub>); 8,0 (m, 2H, H<sub>arom</sub>); 8,09 (s, 1H, H-C(8)); 8,80 (s, 1H, H-C(2)); 8,97 (s, br, 1H, HN)

30 Synthese des N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]-β-D-ribopyranosyl}-adenin-2'-O-succinoyls (13b)

115 mg (0,174 mmol; 1 eq) von N<sup>6</sup>-Benzoyl-3-{3'-desoxy-4'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)-methyl]- β-D-ribopyranosyl}-adenins (9b) wurden zusammen mit 35mg (0,35 mmol; 2 eq) Bernsteinsäure-anhydrid und 25 mg (0,21 mmol; 1,2 eq) DMAP in 1,0 ml abs CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre 2 ½ h bei RT gerührt. Dann wurde mit Methylenechlorid auf 20 ml verdünnt, 1x mit 20 ml 10%iger Zitronensäure und 3x mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die org. Phase

wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Man erhielt 130 mg (99 %) von 13b.

DC (Kieselgel, EtOAc/MeOH 19:1):  $R_f = 0,14$

5

$^1\text{H-NMR}$  ( 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  ):

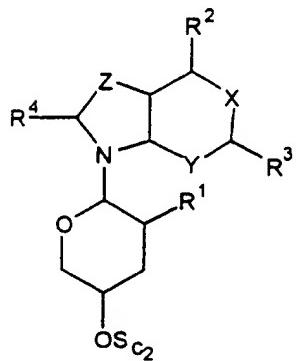
1,82 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ax}}(3')$ ), 2,20 (m, 2H, 2 x  $\text{CH}_2$ ), 2,32 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{eq}}(3')$ ), 3,02 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{eq}}(5')$ ),  
3,30 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{ax}}(5')$ ), 3,73 (d, 6H, 2 x OMe), 3,82 (m, 1H,  $\text{H}(4')$ ), 5,06 (m, 1H,  $\text{H}(2')$ ), 5,55  
(d,  $J = 9,5$  Hz, 1H,  $\text{H}(1')$ ), 6,79 (m, 4H, o zu OMe), 7,14-7,49 (m, 12H, 9H<sub>Trityl</sub>, 3H<sub>Bz</sub>), 7,87-  
7,91 (m, 2H, 2H<sub>Bz</sub>), 7,94 (s, 1H, H-C(8)), 8,55 (s, 1H, H(2)), 9,6 (bs, 1H, -COOH).

10

5

Patentansprüche

1. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure bestehend im wesentlichen aus 3'-  
 10 Desoxypentopyranosyl-Nucleosiden der Formel (I),



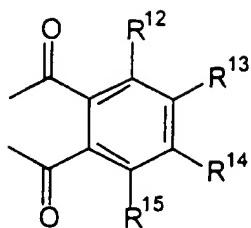
(I),

15 worin

R<sup>1</sup> gleich H, OH, Hal mit Hal gleich Br oder Cl, ein Rest ausgewählt aus

$\text{-O-C(=O)-(CH}_2\text{)}_5\text{-C(=O)-O-} \text{C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$ ,  $\text{-O-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-OH}$  oder  $\text{-O-P[N(i-Pr)}_2\text{]} (\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})$   
 mit i-Pr gleich Isopropyl, oder  $\text{-O-PH-(=O)(-O^-)}$ ,

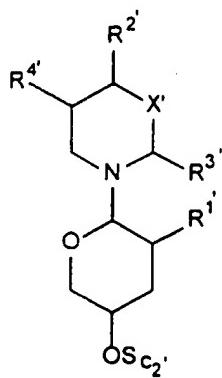
- 20 R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, OR<sup>7</sup>,  
 SR<sup>8</sup>, =O, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> mit n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4,  
 eine  $\beta$ -eliminierbare Gruppe, vorzugsweise eine Gruppe der Formel  $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{R}^{18}$  mit  
 R<sup>18</sup> gleich ein Cyano- oder p-Nitrophenylrest oder ein Fluorenylmethyloxycarbonyl-  
 (Fmoc)-Rest, oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> gleich H, mit R<sup>10</sup>R<sup>11</sup> gleich H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>  
 25 verbunden über einen Rest der Formel



(III),

worin R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup> und R<sup>15</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H,  
 5 OR<sup>7</sup>, wobei R<sup>7</sup> die oben genannte Bedeutung hat, oder C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, oder C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, wobei n die  
 oben genannte Bedeutung hat, bedeuten und  
 R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> und R<sup>8</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>,  
 oder C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, wobei n die oben genannte Bedeutung hat, -C(O)R<sup>9</sup> mit R<sup>9</sup> gleich ein  
 linearer oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter Alkyl-, Aryl-, vorzugsweise  
 10 Phenyl-Rest,  
 X, Y und Z unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-, =C(R<sup>16</sup>)-  
 oder -N(R<sup>17</sup>)- mit R<sup>16</sup> und R<sup>17</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils  
 H oder C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup> mit den oben genannten Bedeutungen, bedeutet,  
 und  
 15 S<sub>c1</sub> Wasserstoff oder eine Schutzgruppe ausgewählt aus einer Acyl-, Trityl- oder  
 photolabilen Schutzgruppe, vorzugsweise eine Dansyl- oder Allyloxycarbonylgruppe,  
 insbesondere eine Benzoyl- oder 4', 4'-Dimethoxytrityl-(DMT-)gruppe,

oder der Formel (II)



(II),

worin R<sup>1</sup> gleich H, OH oder Hal mit Hal gleich Br oder Cl, ein Rest ausgewählt aus R<sup>1</sup> gleich H, OH, Hal mit Hal gleich Br oder Cl, ein Rest ausgewählt aus

5                     $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{O}-\text{C}-(\text{CH}_2)_5-\text{C}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NO}_2, -\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH} \text{ oder } -\text{O}-\text{P}[\text{N}(\text{i-Pr})_2] (\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}) \\ \text{mit i-Pr gleich Isopropyl, oder } -\text{O}-\text{PH}-(=\text{O})(-\text{O}\cdot), \end{array}$

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils H, =O, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> oder OC<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub>, eine β-eliminierbare Gruppe, vorzugsweise vorzugsweise eine Gruppe der Formel -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R<sup>18</sup> mit R<sup>18</sup> gleich ein Cyano- oder p-Nitrophenylrest oder ein Fluorenylmethyloxycarbonyl-(Fmoc)-Rest, oder (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, wobei R<sup>10</sup>R<sup>11</sup> unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R<sup>10</sup> bzw. R<sup>11</sup> hat, und

X', Y' und Z' unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, jeweils =N-, =C(R<sup>16</sup>)- oder -N(R<sup>17</sup>)- bedeutet, wobei R<sup>16</sup> und R<sup>17</sup> unabhängig voneinander die oben genannte Bedeutung von R<sup>16</sup> bzw. R<sup>17</sup> haben, und S<sub>c1</sub>, die oben genannte Bedeutung von S<sub>c1</sub> hat.

2. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid ein Ribo-, Arabino-, Lyxo- und/oder Xylo-pyranosyl-Nucleosid ist, vorzugsweise ein 3'-Desoxyribopyranosyl-Nucleosid.
3. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der 3'-Desoxypentopyranosyl -Teil D- oder L-konfiguriert ist.
- 25 4. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid ein 3'-Desoxypentopyranosyl-purin, -2,6-diaminopurin, -6-purinthiol, -pyridin, -pyrimidin, -adenosin, -guanosin, -isoguanosin, -6-thioguanosin, -xanthin, -hypoxanthin, -thymidin, -cytosin, -isocytosin, -indol, -tryptamin, -N-phthaloyltryptamin, -uracil, -coffein, -theobromin, -theophyllin, -benzotriazol oder -acridin, eingesetzt wird.
- 30 5. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>2</sup>', R<sup>3</sup>' und/oder R<sup>4</sup>' ein 2-Phthalimidoethyl- oder Allyloxy-Rest oder ein Rest der Formel -N[C(O)R<sup>9</sup>]<sub>2</sub> bedeutet.

6. 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß das 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid ein [(2', 4'-Di-O-Benzoyl)-3'-desoxy- $\beta$ -ribopyranosyl]-nucleosid, ein N-Benzoyl-2', 4'-diO-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, ein N-Isobutyroyl-2', 4'-diO-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid; ein O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-2', 4'-diO-benzoyl-3'-desoxy-ribopyranosyl-Nucleosid, 3'-Desoxy- $\beta$ -ribopyranosyl-Nucleosid, ein N-Benzoyl-, N-Isobutyroyl-, O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)- oder O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-3'-Desoxy- $\beta$ -ribopyranosyl-nucleosid, 4'-DMT-3'-desoxypentopyranosyl-Nucleosid, 4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, N-Benzoyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, N-Isobutyroyl-4'-DMT3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, O<sup>6</sup>-(2-Cyanoethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, O<sup>6</sup>-(2-(4-Nitrophenyl)ethyl)-N<sup>2</sup>-isobutyroyl-4'-DMT-3'-desoxyribopyranosyl-Nucleosid, ein 3'-Desoxy- $\beta$ -ribopyranosyl-N,N'-dibenzoyl-adenosin oder ein 3'-Desoxy- $\beta$ -ribopyranosyl -N,N'-dibenzoyl-guanosin ist.
- 5
7. Verfahren zur Herstellung einer 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß
- in einem ersten Schritt ein geschütztes 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid gemäß einem der Ansprüche 1-6 an eine feste Phase gebunden wird und
  - in einem zweiten Schritt das gemäß Schritt (a) an eine feste Phase gebundene 3', 4'-geschützte 3'-Desoxypentopyranosylnukleosid um ein phosphityliertes 3', 4'-geschütztes 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleosid verlängert wird, und
  - Schritt (b) wiederholt wird.
- 20
8. Verfahren nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (a) und/oder Schritt (b) auch Pentofuranosyl-nucleoside eingebaut werden.
- 25
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Kupplungsreagenz für die Verlängerung gemäß Schritt (b) Pyridinium-Hydrochlorid bei Einsatz von Phosphoramiditen und bei Einsatz von H-Phosphonaten Arylsulfonylchloride, Diphenylchlorophosphat, Pivaloylchlorid oder Adamantoylchlorid eingesetzt wird.
- 30

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt (d) die Schutzgruppen und das gebildete Oligomer von der festen Phase abgespalten wird.
- 5      11. Verwendung einer 3'-Desoxypentopyranosyl -Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 zur Herstellung eines Arzneimittels, Diagnostikums und/oder elektronischen Bauteils.
- 10     12. Konjugat enthaltend eine 3'-Desoxypentopyranosyl-Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-6 und ein Biomolekül.
13. Konjugat nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Peptid, Protein oder eine Nucleinsäure ist.
- 15     14. Konjugat nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Antikörper oder ein funktioneller Teil davon oder eine in ihrer natürlichen Form vorkommende DNA und/oder RNA ist.
- 20     15. Diagnostikum und/oder elektronischer Bauteil enthaltend ein Konjugat gemäß einem der Ansprüche 12-14.

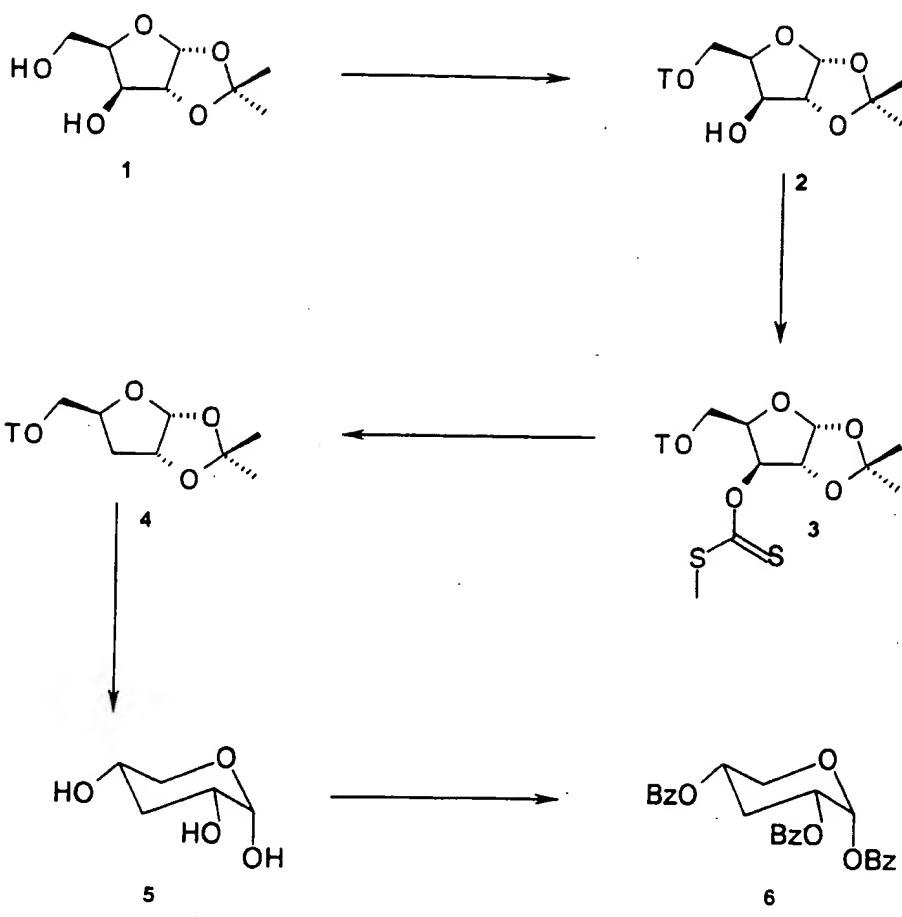


Fig. 1

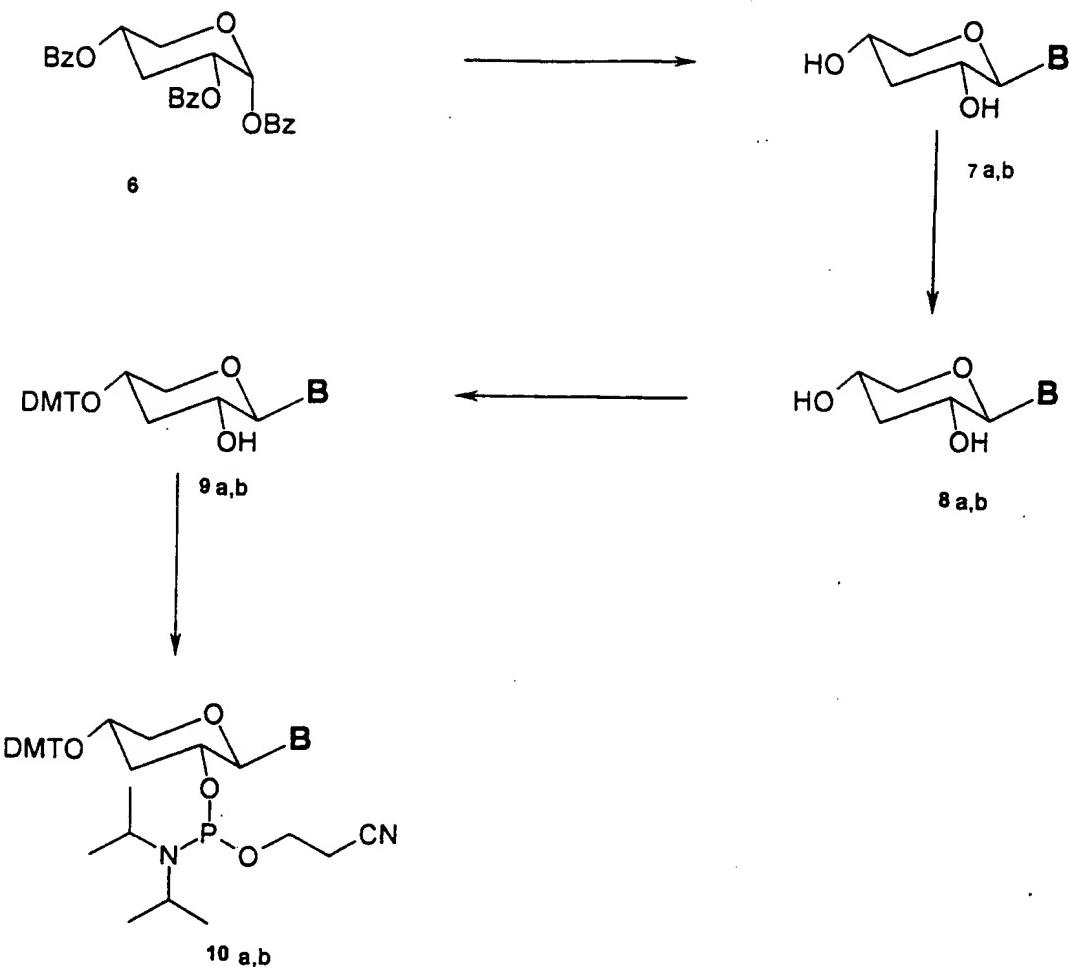
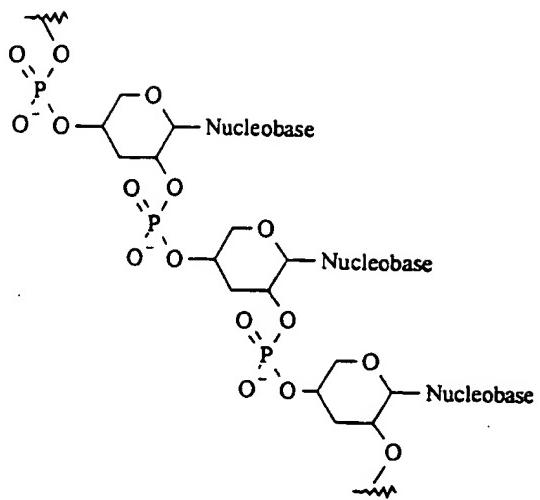
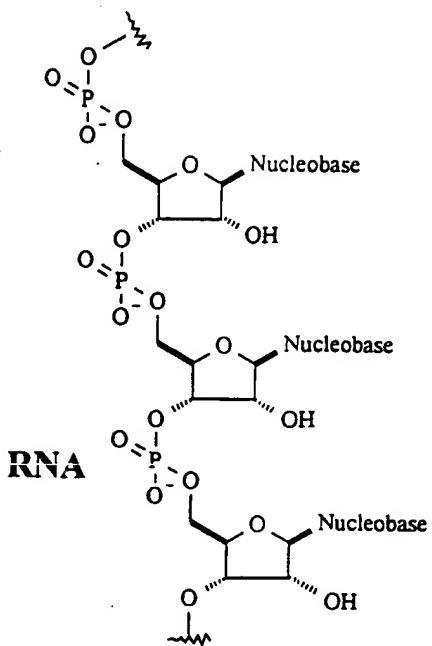


Fig. 2



**3'-Desoxy-pyranosyl-NA  
(p-DNA)**

Fig. 3.

5

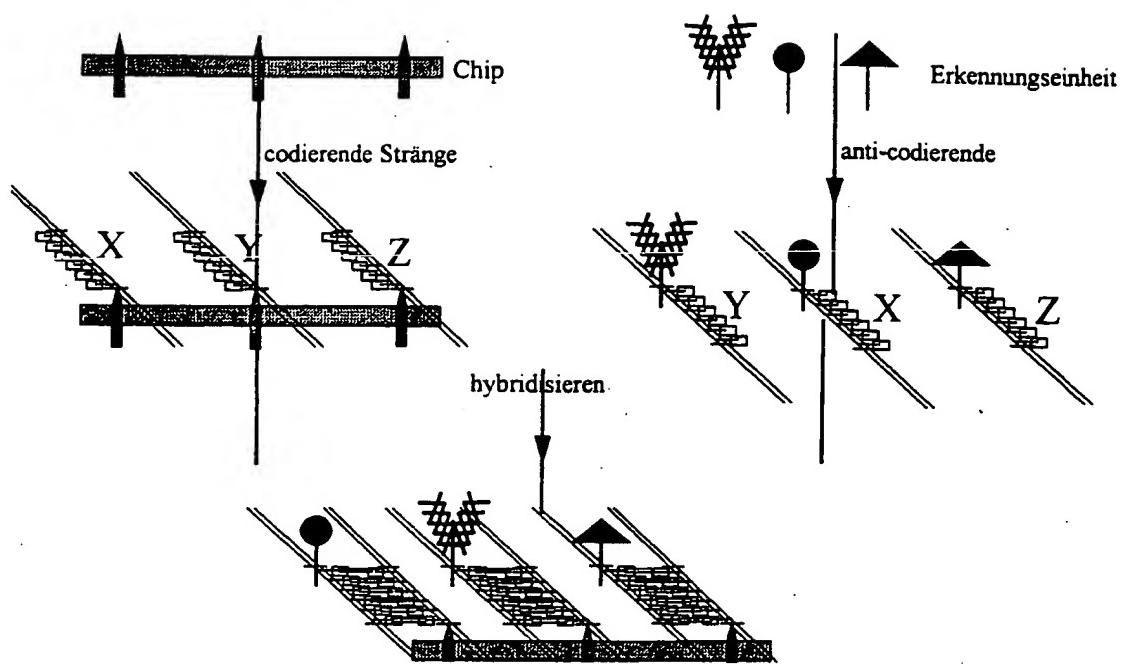


Fig. 4.

10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/06036

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 C07H19/04 C07H21/00 A61K31/70 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 C07H A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X        | <p>B.DOBOSZEWSKI ET AL.: "Easy Synthesis and Different Conformational Behaviour of Purine and Pyrimidine B-D-Glycero-pent-2'-enopyranosyl Nucleosides."<br/> <i>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY</i>,<br/>         vol. 60, no. 24, 1995, pages 7909-7919,<br/>         XP002122435<br/>         AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON., US<br/>         ISSN: 0022-3263<br/>         page 7914, combinaisons 48, 49, 52, 53<br/>         ---<br/>         -/-</p> | 1-4                   |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

12 November 1999

20/12/1999

Name and mailing address of the ISA  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

|                          |
|--------------------------|
| Intern al Application No |
| PCT/EP 99/06036          |

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
|----------|--|-------------------------|
| X        | DIEKMANN E ET AL:<br>"DIDESOXY-RIBONUCLEOSIDE DURCH<br>SCHMELZKONDENSATION DIDEOXY<br>RIBONUCLEOSIDES BY FUSION METHOD"<br>JOURNAL FUR PRAKTISCHE CHEMIE, CHEMIKER<br>ZEITUNG, DE,WILEY VCH. WEINHEIM,<br>vol. 335, no. 5, page 415-424 XP000569335<br>ISSN: 1436-9966<br>page 415, combinaisons 4a-f<br>---   | 1-4                     |
| X        | N.B.KHRIPACH ET AL.: "Glycosylation of<br>N4-Benzoylcytosine and N6-Benzoyladenine<br>by Acetals Glycals."<br>KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN,<br>no. 1, 1982, pages 111-117. XP002122436<br>page 112, combinaisons VI,X,XVII-XIX,XXI<br>---   | 1-4                     |
| X        | K.A.WATANABE ET AL.: "Nucleosides. 118.<br>Total Syntheses of Pentopyranine B and D."<br>CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY,<br>vol. 59, no. 2, 1981, pages 468-472,<br>XP002122437<br>page 468, combinaisons A,B,C,D; page<br>469, combinaisons 8-12,15-18<br>---  | 1-4                     |
| X        | K.A.WATANABE ET AL.: "Nucleosides.<br>LXXXVII. Total Syntheses of Pentopyranine<br>A an α-L-Cytosine Nucleoside Elaborated by<br>Streptomyces Griseochromogenes."<br>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY.,<br>vol. 39, no. 17, 1974, pages 2482-2486,<br>XP002122438<br>AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US<br>ISSN: 0022-3263<br>page 2482, combinaison 2; page 2483,<br>combinaisons 1,15,16,17<br>--- | 1-4                     |
| X        | H.SETO ET AL.: "Biosynthesis of<br>Blasticidin S. IV. Structures of<br>Pentopyranines A and C, Two Cytosine<br>Nucleosides with alpha-L-configuration."<br>AGR. BIOL. CHEM.,<br>vol. 37, no. 10, 1973, pages 2421-2426,<br>XP002122439<br>the whole document<br>---  | 1-4                     |
| A        | WO 96 40711 A (MICROPROBE CORP)<br>19 December 1996 (1996-12-19)<br>claim 1<br>---   | 1,7,11,<br>12,15<br>-/- |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

|         |                |
|---------|----------------|
| Intern: | Application No |
| PCT/EP  | 99/06036       |

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category | Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A        | M BÖHRINGER ET AL: "110. Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren ? Oligonucleotide aus 2',3'-Dideoxy-B-D-glucopyranosyl-Bausteine n ('Homo-DNS?'): Herstellung" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH,VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, vol. 75, no. 5, page 1416-1477 XP002096856 ISSN: 0018-019X abstract ---- | 1,7,11,<br>12,15      |
| A        | I SCHLÖNGOTT ET AL: "188. Pyranosyl-RNA('p-RNA'): NMR and Molecular Dynamics Study of the Duplex Formed by Self-Pairing of Ribopyranosyl-(C-G-A-A-T-T-C-G)" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH,VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, vol. 79, no. 8, page 2316-2346 XP002096829 ISSN: 0018-019X abstract ----           | 1,7,11,<br>12,15      |
| A        | M BOLLI ET AL: "131. Pyranosyl-RNA: Further Observations on Replication" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH,VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, vol. 80, no. 6, page 1901-1951 XP002096832 ISSN: 0018-019X abstract ----  | 1,7,11,<br>12,15      |
| A        | WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18 June 1998 (1998-06-18) the whole document ----   | 1,7,11,<br>12,15      |
| A        | B DOBOSZEWSKI ET AL: "Synthesis of 3'-Deoxy-3'-C-Hydroxymethyl-aldopentopyranosyl Nucleosides and their Incorporation into Oligonucleotides. Part II" TETRAHEDRON,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 51, no. 45, page 12319-12336-12336 XP002096831 ISSN: 0040-4020 abstract ----                 | 1,7,11,<br>12,15      |
|          | ----<br>-/-  |                       |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.  
PCT/EP 99/06036

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A        | <p>S PITSCH ET AL: "122. Pyranosyl-RNA ('p-RNA'): Base-Pairing Selectivity and Potential to Replicate"<br/>         HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL,<br/>         vol. 78, no. 7, page 1621-1635<br/>         XP002096830<br/>         ISSN: 0018-019X<br/>         cited in the application<br/>         the whole document</p> <p>---</p> <p>ESCHENMOSER ET AL: "147. Why pentose- and not hexose-nucleic acids?"<br/>         HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL,<br/>         vol. 76, page 2161-2183 XP002094190<br/>         ISSN: 0018-019X<br/>         cited in the application<br/>         the whole document</p> <p>-----</p> | 1,7,11,<br>12,15      |
| A        |  | 1,7,11,<br>12,15      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

|                 |                   |
|-----------------|-------------------|
| Intern          | al Application No |
| PCT/EP 99/06036 |                   |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) |  | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|--|------------------|
| WO 9640711                             | A 19-12-1996     | US 5849482 A            |  | 15-12-1998       |
|  |                  | AU 709924 B             |  | 09-09-1999       |
|  |                  | AU 6103596 A            |  | 30-12-1996       |
|  |                  | CA 2223584 A            |  | 19-12-1996       |
|  |                  | EP 0842186 A            |  | 20-05-1998       |
|  |                  | JP 11509528 T           |  | 24-08-1999       |
|  |                  | US 5935830 A            |  | 10-08-1999       |
| WO 9825943                             | A 18-06-1998     | DE 19651560 A           |  | 18-06-1998       |
|  |                  | AU 5661298 A            |  | 03-07-1998       |
|  |                  | EP 0944641 A            |  | 29-09-1999       |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interrales Aktenzeichen  
**PCT/EP 99/06036**

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C07H19/04 C07H21/00 A61K31/70 C1201/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
 IPK 7 C07H A61K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHEN UNTERLAGEN**

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| X         | <p>B. DOBOSZEWSKI ET AL.: "Easy Synthesis and Different Conformational Behaviour of Purine and Pyrimidine B-D-Glycero-pent-2'-enopyranosyl Nucleosides." JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY., Bd. 60, Nr. 24, 1995, Seiten 7909-7919, XP002122435 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US ISSN: 0022-3263 Seite 7914, Verbindungen 48,49,52,53</p> <p>---</p> <p>-/-</p> | 1-4                |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12. November 1999

20/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scott, J

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

|  |
|--|
| Internales Aktenzeichen<br>PCT/EP 99/06036 |
|--|

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.      |
|-----------|---|-------------------------|
| X         | DIEKMANN E ET AL:<br>"DIDESOXY-RIBONUCLEOSIDE DURCH<br>SCHMELZKONDENSATION DIDEOXY<br>RIBONUCLEOSIDES BY FUSION METHOD"<br>JOURNAL FÜR PRAKTISCHE CHEMIE, CHEMIKER<br>ZEITUNG, DE, WILEY VCH, WEINHEIM,<br>Bd. 335, Nr. 5, Seite 415-424 XP000569335<br>ISSN: 1436-9966<br>Seite 415, Verbindungen 4a-f<br>---  | 1-4                     |
| X         | N.B.KHRIPACH ET AL.: "Glycosylation of<br>N4-Benzoylcytosine and N6-Benzoyladenine<br>by Acetals Glycals."<br>KHIM. GETEROTSIKL. SOEDIN,<br>Nr. 1, 1982, Seiten 111-117, XP002122436<br>Seite 112, Verbindungen VI,X,XVII-XIX,XXI<br>---  | 1-4                     |
| X         | K.A.WATANABE ET AL.: "Nucleosides. 118.<br>Total Syntheses of Pentopyranine B and D."<br>CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY,<br>Bd. 59, Nr. 2, 1981, Seiten 468-472,<br>XP002122437<br>Seite 468, Verbindungen A,B,C,D; Seite<br>469, Verbindungen 8-12,15-18<br>---   | 1-4                     |
| X         | K.A.WATANABE ET AL.: "Nucleosides.<br>LXXXVII. Total Syntheses of Pentopyranine<br>A an α-L-Cytosine Nucleoside Elaborated by<br>Streptomyces Griseochromogenes."<br>JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY.,<br>Bd. 39, Nr. 17, 1974, Seiten 2482-2486,<br>XP002122438<br>AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON., US<br>ISSN: 0022-3263<br>Seite 2482, Verbindung 2; Seite 2483,<br>Verbindungen 1,15,16,17<br>--- | 1-4                     |
| X         | H.SETO ET AL.: "Biosynthesis of<br>Blasticidin S. IV. Structures of<br>Pentopyranines A and C, Two Cytosine<br>Nucleosides with alpha-L-configuration."<br>AGR. BIOL. CHEM.,<br>Bd. 37, Nr. 10, 1973, Seiten 2421-2426,<br>XP002122439<br>das ganze Dokument<br>---   | 1-4                     |
| A         | WO 96 40711 A (MICROPROBE CORP)<br>19. Dezember 1996 (1996-12-19)<br>Anspruch 1<br>---  | 1,7,11,<br>12,15<br>-/- |

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

|                 |                   |
|-----------------|-------------------|
| Intern          | ales Aktenzeichen |
| PCT/EP 99/06036 |                   |

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie: | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | M BÖHRINGER ET AL: "110. Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren ? Oligonucleotide aus 2',3'-Dideoxy-B-D-glucopyranosyl-Bausteine n ('Homo-DNS?'): Herstellung" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, Bd. 75, Nr. 5, Seite 1416-1477 XP002096856 ISSN: 0018-019X Zusammenfassung --- | 1,7,11,<br>12,15   |
| A          | I SCHLÖNVOGT ET AL: "188. Pyranosyl-RNA('p-RNA'): NMR and Molecular Dynamics Study of the Duplex Formed by Self-Pairing of Ribopyranosyl-(C-G-A-A-T-T-C-G)" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, Bd. 79, Nr. 8, Seite 2316-2346 XP002096829 ISSN: 0018-019X Zusammenfassung ---           | 1,7,11,<br>12,15   |
| A          | M BOLLI ET AL: "131. Pyranosyl-RNA: Further Observations on Replication" HELVETICA CHIMICA ACTA,CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA. BASEL, Bd. 80, Nr. 6, Seite 1901-1951 XP002096832 ISSN: 0018-019X Zusammenfassung ---  | 1,7,11,<br>12,15   |
| A          | WO 98 25943 A (ESCHENMOSER ALBERT ;HOPPE HANS ULRICH (DE); MICULKA CHRISTIAN (DE)) 18. Juni 1998 (1998-06-18) das ganze Dokument ---  | 1,7,11,<br>12,15   |
| A          | B DOBOSZEWSKI ET AL: "Synthesis of 3'-Deoxy-3'-C-Hydroxymethyl-aldopentopyranosyl Nucleosides and their Incorporation into Oligonucleotides. Part II" TETRAHEDRON,NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 51, Nr. 45, Seite 12319-12336-12336 XP002096831 ISSN: 0040-4020 Zusammenfassung ---                 | 1,7,11,<br>12,15   |
|            |   | -/-                |

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| Intern          | als Aktenzeichen |
| PCT/EP 99/06036 |                  |

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| A         | <p>S PITSCHE ET AL: "122. Pyranosyl-RNA ('p-RNA'): Base-Pairing Selectivity and Potential to Replicate"<br/>         HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL,<br/>         Bd. 78, Nr. 7, Seite 1621-1635<br/>         XP002096830<br/>         ISSN: 0018-019X<br/>         in der Anmeldung erwähnt<br/>         das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1,7,11,<br>12,15   |
| A         | <p>ESCHENMOUSER ET AL: "147. Why pentose- and not hexose-nucleic acids?"<br/>         HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL,<br/>         Bd. 76, Seite 2161-2183 XP002094190<br/>         ISSN: 0018-019X<br/>         in der Anmeldung erwähnt<br/>         das ganze Dokument</p> <p>-----</p>  | 1,7,11,<br>12,15   |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

|                 |                  |
|-----------------|------------------|
| Intern:         | des Aktenzeichen |
| PCT/EP 99/06036 |                  |

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |            | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------------------------|
| WO 9640711 A                                       | 19-12-1996                    | US                                | 5849482 A  | 15-12-1998                    |
|  |                               | AU                                | 709924 B   | 09-09-1999                    |
|  |                               | AU                                | 6103596 A  | 30-12-1996                    |
|  |                               | CA                                | 2223584 A  | 19-12-1996                    |
|  |                               | EP                                | .0842186 A | 20-05-1998                    |
|  |                               | JP                                | 11509528 T | 24-08-1999                    |
|  |                               | US                                | 5935830 A  | 10-08-1999                    |
| -----  | -----                         | -----                             | -----      | -----                         |
| WO 9825943 A                                       | 18-06-1998                    | DE                                | 19651560 A | 18-06-1998                    |
|  |                               | AU                                | 5661298 A  | 03-07-1998                    |
|  |                               | EP                                | 0944641 A  | 29-09-1999                    |
| -----  | -----                         | -----                             | -----      | -----                         |